大鼠惊吓模型尿液蛋白质组学分析

赵晨阳 [1#]，刘禹卿 [1#]，高友鹤 [1*]

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

摘要：

惊吓带来的恐惧情绪是大脑产生的，我们试图用尿液蛋白质组学探索这种恐惧情绪能否在尿液中检测出来。我们采用天敌气味和声音刺激两种方式相结合共同建立了大鼠惊吓模型，在惊吓前后采集尿液样本并进行蛋白质组学分析。结果发现，惊吓后和惊吓前作比较，筛选出22 个差异蛋白，这些差异蛋白富集到的生物学通路和神经递质运输、葡萄糖跨膜运输相关，这可能是惊吓引起的神经紧张状态表现。对每只大鼠进行了自身的前后对照分析发现，其中有 1 个蛋白被 5 只大鼠共同鉴定到，另外有 19 个蛋白被 4 只大鼠共同鉴定到，这些蛋白与神经、运动、代谢和血压的变化密切相关。其中包括谷氨酸—半胱氨酸连接酶催化亚基及其调节亚基，谷氨酸—半胱氨酸连接酶的功能可能和惊吓有关。这为研究惊吓的机制奠定了基础，为寻找治疗恐怖心理的药靶提供了新方法，同时充分说明了尿液的灵敏性，为尿液的探索开辟了新的领域。

关键词：尿液，蛋白质组学，惊吓模型

Urine proteomic analysis of rat startle model

Chenyang Zhao[1#] Yuqing Liu[1#] Youhe Gao[1*]

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract：

The fear of startle is generated in the brain, and urine proteomics was used to explore whether this fear can be detected in the urine. The combination of natural enemy odor and sound stimulation were used to establish a rat model of startle. Urine samples were collected before and after startle and proteomic analysis was performed. The results showed that 22 differential proteins were identified after startle, and the biological pathways enriched in these differential proteins were related to neurotransmitter transport and glucose transmembrane transport, which may be the manifestations of nervous tension caused by startle. Before-after study in single rat was performed and found that there was one differential protein identified samely in five rats, in addition, 19 differential proteins were identified samely in four of five rats, and these proteins were associated with the change of nerve, motion, metabolism and blood pressure, which include catalytic subunits and regulatory subunits of glutamate-cysteine ligase, which realted to the function of startle. These results laid the foundation for the research of startle mechanism, and to find medicine for the treatment of psychological terror target provides a new method. At the same time, it fully illustrates the sensitivity of urine and opens up a new field for the exploration of urine.

Keywords： urine; proteomics; startle model

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）；北京师范大学（11100704）

作者简介：1.赵晨阳（1998.03—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；2.刘禹卿.（共一）（1999.12—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物

通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

1 引言

惊吓是生活中经常出现的一种行为，惊吓带来的恐惧情绪是大脑产生的对这种行为的反映。俗话说 “一朝被蛇咬，十年怕井绳”，不同程度的惊吓都会对我们的生活产生一定的影响，目前没有探索到和惊吓有关的生理指标，更没有人从尿液中去观察惊吓带来的变化。本研究正是尝试用尿液蛋白质组学去探索这种恐惧情绪能否在尿液中检测出来。在尿液蛋白质组学的研究中，大部分是利用尿液蛋白质组学方法寻找和疾病相关的生物标志物，相对于最广泛应用的标志物来源血液相比，尿液是血液滤过的产物，不受体内稳态机制的严格调节，可以容纳并积累更多、更大的变化[1]，且尿蛋白可在较长时间内保持稳定[2]，尿液蛋白质组的复杂性相对较低，更容易检测到低丰度蛋白质的变化特征[3]，可见尿液是良好的生物标志物来源。由于尿液蛋白质组易受多种因素的影响，如饮食、药物治疗、日常活动等，要使实验结果更为准确，关键是采用简单且可控制的系统。由于动物模型的遗传和环境因素可以人为控制，能够最大程度减小无关的影响因素，因此采用动物模型是一种非常合适的实验方法。

目前已经有很多研究表明，尿液在寻找精神系统疾病生物标志物方面有很大应用，例如帕金森综合征[4]、阿尔兹海默症[5]、抑郁症[6]等疾病。因此我们建立了大鼠惊吓模型，采用天敌气味和声音刺激两种方式相结合共同建立了大鼠惊吓模型，在惊吓前后采集尿液样本并进行蛋白质组学分析，试图用尿液蛋白质组学探索这种恐惧情绪能否在尿液中检测出来。

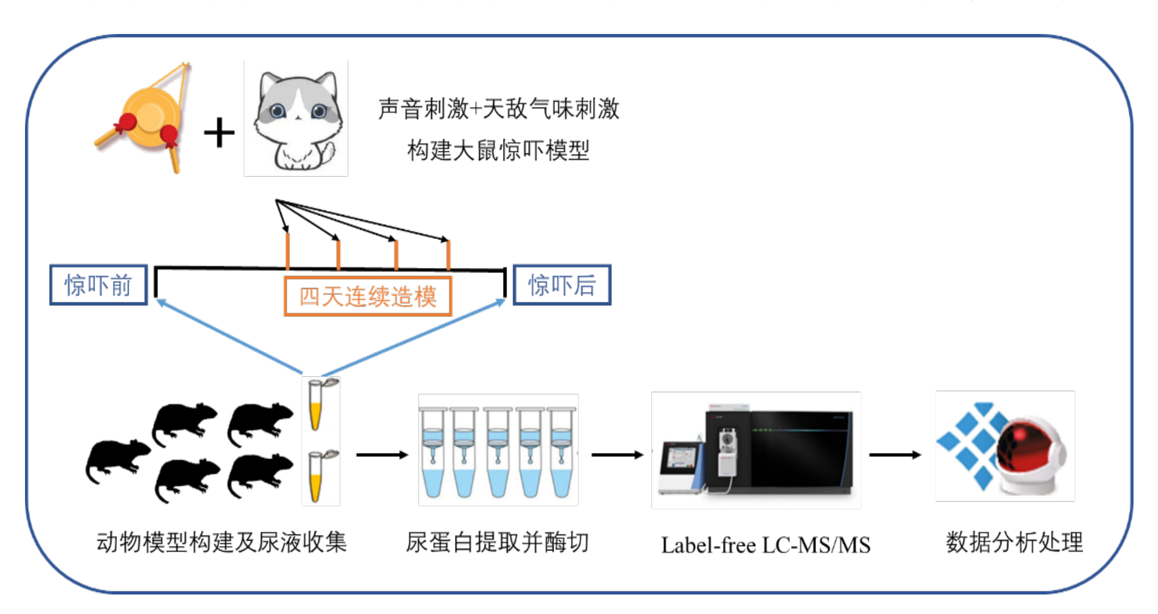


图 1 技术路线

Figure 1 Technical roadmap

2 材料与方法

2. 1 惊吓动物模型的建立

健康 SD（Sprague Dawley）雄性大鼠（160±20g），5 只，购于北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠在标准环境中（室温（22±1）℃，湿度 65%-70%）饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准。

惊吓动物模型建立方法如下：采用自身前后对照的方式，将 5 只大鼠每只单独置于新鲜的猫砂混合垫料中，同时于每天同一时间进行高强度声音刺激，记录大鼠表现行为。

2. 2 尿液样品的收集

大鼠惊吓处理前统一将大鼠置于代谢笼中收集 12h 的尿液，然后在标准环境下饲养 3 天后进行惊吓实验，每天 1 次，连续 4 天，第 4 天惊吓处理后再将大鼠置于代谢笼中收集 12h 的尿液，在尿液收集过程中大鼠禁食禁水，两次收集的尿液都放入−80℃冰箱保存。

2.3 尿液样品的处理

尿蛋白提取和定量：将 2 个时间点收集到的大鼠尿液在 4℃的条件下以 12000×g 离心 40min，取上清液转移到新的 EP 管中，三倍上清体积加入预冷乙醇。均匀混合后在-20℃条件下沉淀过夜。第二天将乙醇上清混合液于 4℃，12000×g 离心 30min，弃上清，留蛋白沉淀，倒扣于滤纸上，用吹风机冷风吹干；后将蛋白沉淀重悬于 120ul 裂解液中(8mol/L 尿素，2mol/L 硫脲，25mmol/L 二硫苏糖醇，50mmol/L Tris)，用枪头反复吹打，直到无沉淀为止，并于涡旋混合器完全混匀 2 小时。混合均匀后 4℃的条件下 12000×g 离心 30min，取上清蛋白置于新的 EP 管内，用 Bradford 法测量蛋白浓度。

尿蛋白酶切：取 100ug 尿蛋白样品加入到 10kDa 超滤管的滤膜(Pall, Port Washington, NY, USA)上，置于 1.5mL 离心管中，加入 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液使总体积为 200uL。后加入 20mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀后，金属浴 97℃加热 5min，冷却至室温。加入 50 mM 的碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），混匀后点甩一下，室温避光反应 40min。而后进行洗膜操作：①加入 200ul UA 溶液(8mol/L 尿素，0.1mol/L Tris-HCl，pH8.5)，按照 14000×g 5min 18℃的条件离心洗涤两次；②上样：加入刚刚处理的样品，在 14000×g 40min 18℃ 条件下进行离心；③加入 200uL UA 溶液，18℃条件下按 14000×g 离心 40min，重复两次；④加入 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液，在 14000×g 40min 18℃条件下离心，重复两次；⑤以胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃水浴过夜。最后通过 HLB 柱(Waters，Milford，MA)除盐，用真空干燥仪进行抽干，存入-80℃条件下保存。

2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

酶解后的样品加入 0.1%的甲酸复溶，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5ug/uL。取每个样品 9ul 制备混合多肽样，按照说明书，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液（Fractions），使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶。以样品：iRT 为 10：1 的体积比例加入 iRT（Biognosis 公司）。每个样品（单个实验样品和十个 Fractions）取 1ug 使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)进行质谱分析并采集数据。

2.5 数据处理

十个 Fractions 的 raw 文件通过 PD（Proteome Discoverer 2.1）软件进行分析，分析结果用于建立 DIA 采集方法。新建立的 DIA 方法用于进行单个样品的 DIA 模式采集。采集结束使用 Spectronaut X 软件对质谱数据进行处理和分析。导入每个样本 DIA 采集的 raw 文件进行搜库。采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

2.6 数据分析

采取自身对照的方式，将惊吓前后鉴定到的蛋白进行比较，进行差异蛋白的筛选。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（Fold change）≥1.5 或≤0. 67，配对 t 检验分析的 P 值＜0.01。对筛选到的差异蛋白使用 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）和 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行生物学分析，并在 Pubmed 数据库上对已报道文献进行检索

对差异蛋白进行功能分析。

3 结果与讨论

3.1 惊吓前后尿液蛋白质组变化分析

（1）尿液蛋白质鉴定和非监督聚类分析

大鼠惊吓模型建立后，对所收集到的惊吓前后共 10 个尿液蛋白样品进行 LC-MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 1294 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%）。总蛋白进行非监督聚类的分析，分析结果见图 2，可见惊吓前后组别区分非常明显，充分说明了尿液蛋白组组学可以显著区分惊吓带来的变化。

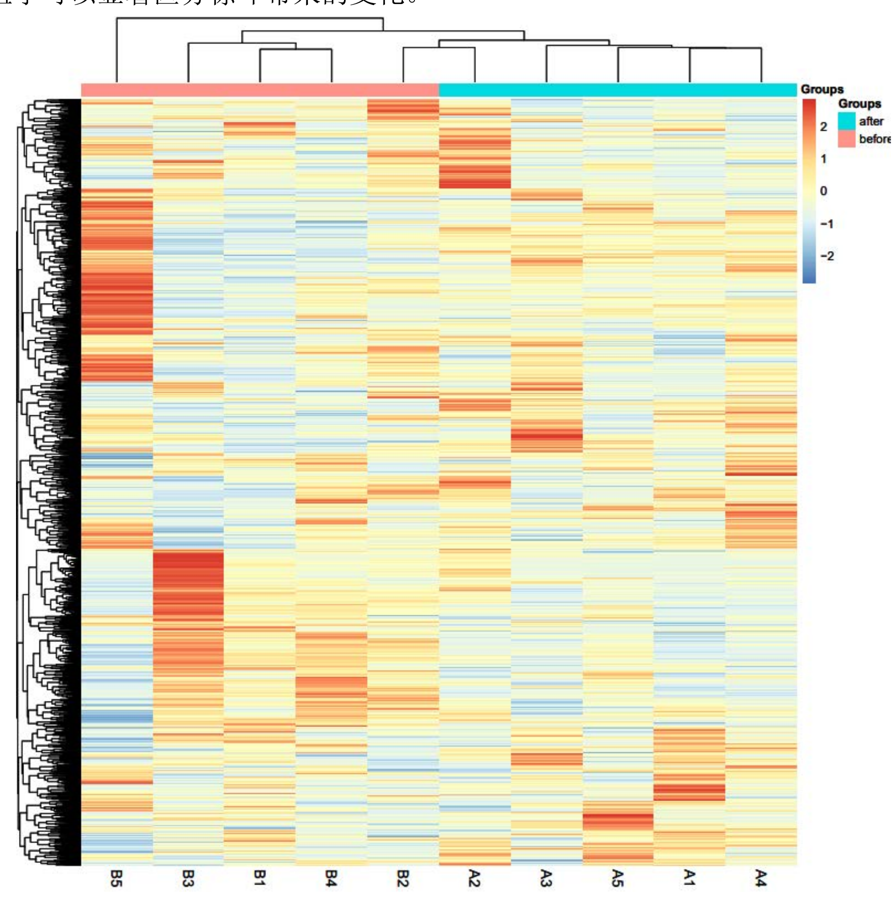


图 2 鉴定总蛋白非监督聚类分析

Figure 2 HCA analysis of identified urine proteins

将惊吓前后的尿蛋白进行比较，筛选差异蛋白的标准为：组间变化倍数 FC≥1.5 或≤0.67，双尾非配对 t 检验 P<0.01。结果表明，惊吓后和惊吓前相比较，可以鉴定到 22 个差异蛋白，差异蛋白的具体信息见表 1。

表 1 差异蛋白信息

Table 1 Details of differential proteins

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
F1LUS1	Ig-like domain-containing protein	7.58	↑	1.81E-03
P61972	Nuclear transport factor 2	2.24	↑	1.40E-04
G3V8Z5	Ig-like domain-containing protein	1.78	↑	9.83E-03
D4A9Q5	Carboxypeptidase M	1.76	↑	6.28E-03

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
Q6AXR4	Beta-hexosaminidase subunit beta	1.73	↑	4.21E-03
P85971	6-phosphogluconolactonase	1.62	↑	1.70E-03
A0A0G2K3W2	Coagulation factor V	1.59	↑	9.50E-03
G3V6V1	Aminopeptidase B	1.56	↑	1.79E-03
Q7TPK2	Ac2-120	1.55	↑	7.45E-03
G3V647	Pyridoxal kinase	0.65	↓	5.73E-03
P63029	Translationally-controlled tumor protein	0.65	↓	7.57E-03
P48500	Triosephosphate isomerase	0.63	↓	3.46E-03
Q99MA2	Xaa-Pro aminopeptidase 2	0.58	↓	5.82E-04
Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	0.58	↓	6.86E-03
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	0.55	↓	9.73E-03
P62749	Hippocalcin-like protein 1	0.53	↓	6.00E-04
Q9ESG3	Collectrin	0.49	↓	1.43E-03
P46413	Glutathione synthetase	0.48	↓	6.50E-03
P29975	Aquaporin-1	0.46	↓	7.57E-04
Q64319	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	0.33	↓	7.72E-03
G3V8X5	Solute carrier family 5	0.32	↓	5.49E-03
A0A0G2JT43	Solute carrier family 2	0.25	↓	4.98E-03

（2）差异蛋白功能分析

为了探究这些差异蛋白的功能，我们利用 DAVID 数据库对差异蛋白进行了生物学通路的功能分析，结果表明，大部分通路显示的是代谢带来的变化，比如尿酸盐代谢和转运、CO2 运输、有机阴离子运输等等，值得注意的是，这些差异蛋白同样富集到了神经递质运输、葡萄糖跨膜运输等生物学通路，这可能是惊吓引起的神经紧张状态表现，说明了尿液的灵敏性。

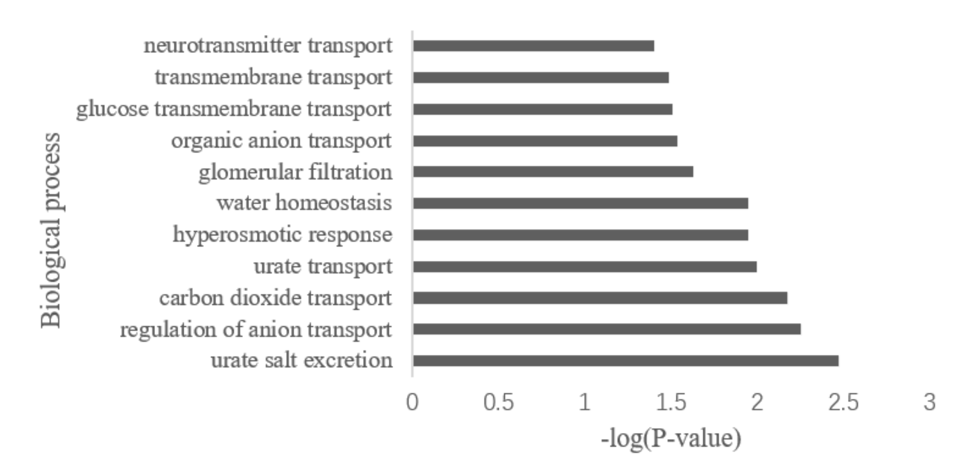


图 3　差异蛋白生物学通路分析

Figure 3　Biological process analysis of differential proteins

3.2 单只大鼠惊吓前后尿液蛋白质组变化分析

为了探究五只大鼠的变化是否有一致性，我们对每一只大鼠单独进行了惊吓前后自身对照的尿液蛋白质组学分析。每只大鼠将惊吓后和惊吓前作比较，筛选差异蛋白条件为：FC≥2或≤0.5，双尾非配对 t 检验 P<0.01，差异蛋白筛选结果如下：1 号大鼠共筛选到了 132 个差异蛋白，其中 44 个蛋白呈上调趋势，88 个蛋白呈下调趋势；2 号大鼠共筛选到了 79 个差异蛋白，其中 33 个蛋白呈上调趋势，46 个蛋白呈下调趋势；3 号大鼠共筛选到了 215 个差异蛋白，其中 38 个蛋白呈上调趋势，177 个蛋白呈下调趋势；4 号大鼠共筛选到了 91 个差异蛋白，其中 22 个蛋白呈上调趋势，69 个蛋白呈下调趋势；5 号大鼠共筛选到了 134 个差异蛋白，其中 94 个蛋白呈上调趋势，40 个蛋白呈下调趋势。我们对五只大鼠鉴定到的差异蛋白做了韦恩图展示（图 4），其中有 1 个蛋白被共同鉴定到，即谷氨酸—半胱氨酸连接酶调节亚基（P48508），另外有 19 个蛋白被 4 只大鼠共同鉴定到，我们将这 20 个蛋白质对应的人源蛋白的具体信息和相关研究列于表 2，发现这些差异蛋白与神经、运动、代谢和血压的变化密切相关。另外谷氨酸—半胱氨酸连接酶调节亚基和催化亚基分别被 5 只大鼠和 4 只大鼠共同鉴定到，提示着这些差异蛋白因实验动物个体差异而产生的可能性比较小，我们观察到的差异是因为惊吓而产生的可能性更大。

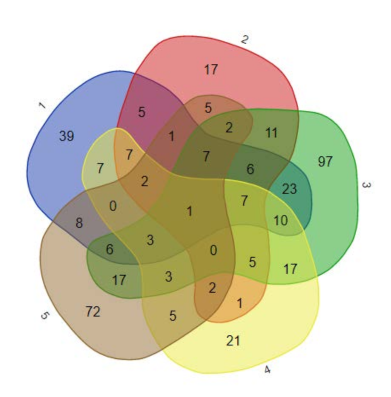


图 4　单只大鼠差异蛋白韦恩图

Figure 4　Veen map of differential proteins in single rat

表 2　共同鉴定到的差异蛋白（人源）

Table 2　The co-identified differential proteins（homo sapiens）

Uniprot ID	Protein names	relevant research
P48507	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	
Q07837	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	
P15104	Glutamine synthetase	Epileptogenesis [7]
A0PJK1	Sodium/glucose cotransporter 5	
P48506	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	
A8K7I4	Calcium-activated chloride channel regulator 1	
Q9Y6R7	IgGFc-binding protein	
P08118	Beta-microseminoprotein	
Q3LXA3	Triokinase/FMN cyclase	
P07098	Gastric triacylglycerol lipase	
Q9Y2S2	Lambda-crystallin homolog	
O00159	Unconventional myosin-Ic	
Q9H4M9	EH domain-containing protein 1	

Uniprot ID	Protein names	relevant research
P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase	oxidative stress[8]
P60709	Actin, cytoplasmic 1	
P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	

4 结论

本研究利用天敌和声音共同刺激建立了大鼠惊吓模型，通过对惊吓前后收集的尿液进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定和分析，试图用尿液蛋白质组学的方法探索因惊吓引起的恐惧情绪能否在尿液中检测出来。统计分析结果显示，惊吓后和惊吓前作比较，筛选出 22 个差异蛋白，这些差异蛋白富集到的生物学通路和神经递质运输、葡萄糖跨膜运输相关，这可能是惊吓引起的神经紧张状态表现；通过对单只大鼠前后自身对照的尿蛋白分析，我们发现有谷氨酸—半胱氨酸连接酶的调节亚基和催化亚基分别被 5 只大鼠和 4 只大鼠共同鉴定到，谷氨酸—半胱氨酸连接酶与惊吓的机制相关，而其他的共同鉴定蛋白也和神经、运动、代谢和血压变化相关，这为研究惊吓的机制奠定了基础，为寻找治疗恐怖心理的药靶提供了新方法，同时充分说明了尿液的灵敏性，为尿液的探索开辟了新的领域。

参考文献：

1. Gao, Y., *Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?* Science China. Life sciences, 2013. **56**(12): p. 1145-1146.
2. Good, D.M., et al., *Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future.* J Proteome Res, 2007. **6**(12): p. 4549-55.
3. Paul, P., et al., *Bioinformatics for Renal and Urinary Proteomics: Call for Aggrandization.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).
4. Virreira Winter, S., et al., *Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease.* EMBO Mol Med, 2021. **13**(3): p. e13257.
5. Watanabe, Y., et al., *Urinary Apolipoprotein C3 Is a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease.* Dement Geriatr Cogn Dis Extra, 2020. **10**(3): p. 94-104.
6. Huan, Y., et al., *Urine proteome changes in a chronic unpredictable mild stress (CUMS) mouse model of major depressive disorder.* J Pharm Biomed Anal, 2021. **199**: p. 114064.
7. Eid, T., et al., *Astrocytes and Glutamine Synthetase in Epileptogenesis.* J Neurosci Res, 2019. **97**(11): p. 1345-1362.
8. Matasova, L.V. and T.N. Popova, *Aconitate hydratase of mammals under oxidative stress.* Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(9): p. 957-64.

作者贡献声明 ：

高友鹤：提出研究思路，设计研究方案、论文最终版本修订；
赵晨阳：进行实验、论文起草、数据采集、分析；
刘禹卿：进行实验、数据采集、分析。